解脂耶氏酵母细胞表面展示乳糖水解酶高效水解乳糖*

王艺颖　程海荣**
（上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240）

摘要 乳糖是婴幼儿获取能量的重要碳源之一，但乳糖需要在乳糖酶的作用下水解成半乳糖与葡萄糖后才能被吸收。缺少乳糖分解酶的婴幼儿在摄入含乳糖的食品后，未被消化的乳糖会直接进入大肠，刺激大肠蠕动加快，造成一系列不适应症状即乳糖不耐症，我国属于乳糖不耐症高发国家。因此，解决乳糖的体外水解问题对减轻该症状有重要的意义。研究通过将β-半乳糖苷酶（也称为乳糖水解酶）表面展示在食品安全微生物解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)细胞表面，通过培养获得该酵母，然后直接利用酵母细胞来水解乳糖生成半乳糖与葡萄糖。采用该工程酵母细胞（HCY10），能在 24 小时内完全水解 50 g/L 的乳糖，生成半乳糖与葡萄糖。该方法具有高效、简便的优点，能为乳糖的高效水解提供一条新的途径。

关键词 乳糖 β-半乳糖苷酶 乳糖水解酶 解脂耶氏酵母 酵母表面展示技术
中图分类号 Q819

* 国家自然科学基金（No. 21661140002）的资助项目
**通讯作者，电子邮箱：chrqrq@sjtu.edu.cn

乳糖是一种双糖，其分子是由一分子葡萄糖和一分子半乳糖组成[1]。乳糖在人体中不能直接被吸收，需要在乳糖酶的作用下分解才能被吸收，缺少乳糖分解酶的人群在摄入乳糖后，未被消化的乳糖直接进入大肠，刺激大肠蠕动加快，造成腹鸣、腹泻等症状即为乳糖不耐症，该症状与饮食习惯以及生活水平密切相关，我国属于乳糖不耐症高发国家，儿童发生率尤其高，因此，解决此问题对减轻该症状有重要的意义[2-4]。

分解乳糖生成半乳糖的方法大概有两种，分别是酸解法和酶解法，酸解法就是普通乳糖水解的方法，在高温高压的条件下，以无机酸作为催化剂，水解乳糖生成半乳糖，此方法工艺简单，但生产效率低，设备要求高，而且水解过程中副产物较多，高温可使蛋白变性，且水解乳糖不彻底，之前工业化多使用此方法。另外一种方法就是酶解法，条件温和，产物简单，之前没有高效的水解酶，且生产过程中酶活性低，过程难以控制，导致酶解法生产半乳糖较为困难。如今，随着人们对β -半乳糖苷酶的研究，出现了很多高效的半乳糖苷酶[5]。

β-半乳糖苷酶是一类催化乳糖β-1，4 糖苷键发生水解断裂的酶，该酶具有水解和转糖苷两种功能，可以水解乳糖生成一分子葡萄糖和一分子的半乳糖，此酶广泛存在于自然界中的植物与微生物中[6]，虽然β-半乳糖苷酶的来源众多，但并不是所有来源的β-半乳糖苷酶都可以用于食品工业或者商业生产，用于食品生产的酶源要符合相关食品安全法规。大肠杆菌β-半乳糖苷酶在生产过程中易受内毒素污染，所以在食品生产中是禁用的，而来源于米曲酶的β-半乳糖苷酶则符合食品安全的要求。β-半乳糖苷酶水解乳糖生成半乳糖，不仅解决了乳糖不耐群体关于乳制品使用问题，而且水解乳糖后生成的半乳糖甜度比乳糖高，可以增加乳制品的甜度，降低乳制品中甜味剂的使用量，同时以半乳糖为原料可以合成塔格糖以及抗癌药物[7]。如有着抗癌、抗结核病毒、抗炎等生理功效的半乳糖伯基氧化物和肝靶向抗癌前药去甲斑蝥素-半乳糖偶联物[8]。

本论文中将来自米曲霉的β-半乳糖苷酶展示在解脂耶氏酵母表面，比起传统的酶法合成更环保、成本更低。自从 1985 年报道的丝状噬菌体蛋白质（filamentous phage-coat protein）表面展示[9]和 1986 年报道的大肠杆菌膜蛋白（membrane protein)表面展示[10]以来，一系列新的表面展示系统随之而来，如噬菌体表面展示系统、细菌表面展示系统和酵母表面展示系统[11-14]，酵母作为具有细胞壁的真核生物，具有真核细胞蛋白质折叠、mRNA 加工、蛋白水解、糖基化和异构化等功能，是目前应用最广泛的表面展示宿主。近几年来，酵母表面展示技术在微生物酶生产应用中发挥越来越重要的作用[15-18]。目前，应用于酵母表面展示技术的宿主菌主要有三种：酿酒酵母 *S. cerevisiae* 、毕赤酵母 *P. pastoris*、解脂耶氏酵母 *Y. lipolytica*。本论文采用解脂耶氏酵母作为细胞表面展示的宿主菌，解脂耶氏酵母是公认安全的非常规酵母菌株，在食品发酵领域具有重要作用，有的能合成柠檬酸[19-21]，有的能高效合成赤藓糖醇[22]，有的能由果糖高效合成甘露醇[23]，同时，该酵母也是常用的异源蛋白表达宿主，用于高效表达具有功能的酶[24]。

本论文以合成赤藓糖醇的解脂耶氏酵母为出发菌株，通过分子生物学的基本方法，采用表面展示技术构建一株能自身合成β-半乳糖苷酶的新菌株，使该菌株除了具备出发菌株合成赤藓糖醇的性能外，还可以利用该酵母细胞合成半乳糖，并且可以重复利用该细胞，节约成本。

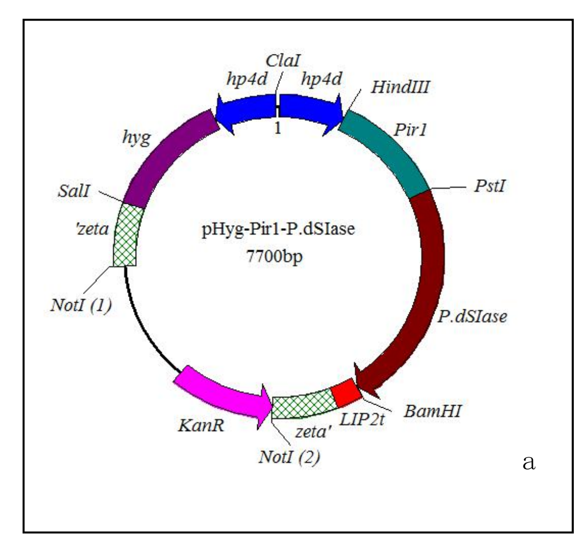
1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

大肠杆菌 Top10 作为质粒扩增宿主，BL21(DE3)作为质粒表达宿主，均为本实验室保存，LB（10 g/L 蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，10 g/L NaCl）培养基 37℃培养，LB 中添加 100 μg/mL 卡纳霉素（*Kanamycin*）作为筛选使用。酵母 *Yarrowia lipolytica* CGMCC7326 作为酵母表面展示宿主，为本实验保存，YPD (10 g/L 蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，20 g/L 葡萄糖) 培养基 30°C 培养，YPD 中添加 500 μg/mL 潮霉素 B（*Hygromycin* B）作为转化子筛选平板。

1.2 包含β-半乳糖苷酶（β-galactosidase）基因的酵母展示载体的构建

β-半乳糖苷酶基因来自 *Aspergillus oryzae* 112 (Genbank accession no. KF857462,3018 bp)，经过在线分析软件分析预测（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/），该基因含有一段编码 18 个氨基酸信号肽的序列，在与 *Y. lipolytica* 细胞壁蛋白融合前，将该信号肽序列去除。去除信号肽编码序列后的基因大小为 2964 bp [1]。该基因按照酵母 *Yarrowia lipolytica* 密码子进行优化并委托苏州金唯智生物技术有限公司进行全基因合成，合成后亚克隆到用 *Bam*HI 与 *Pst*I 双切的载体 pHyg-Pir1-P.dSIase 中[25](图 1a)，构成新质粒 pHyg-Pir1-Gal（图 1b）。转化大肠杆菌 Top10 来获得大量的克隆，在含有卡那霉素的 LB 平板（10 g/L 蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，5 g/L 氯化钠）筛选阳性克隆，筛选的阳性克隆用正向引物 P_{Gal}-F（5'-GGATCCGCTTCCATCAAGCATCGACTCAACGG-3'）以及反向引物 P_{Gal}-R（5'-CTCGAGTTAGTAGGCTCCCTTTCGCTGCTC-3')进行测序以确定序列正确。



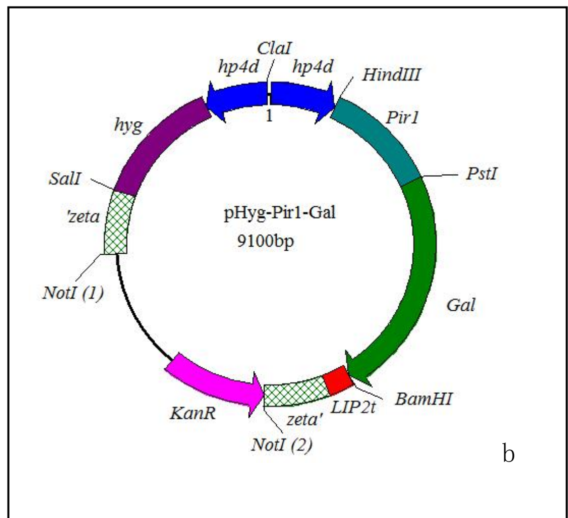


图 1 含来自米曲霉 112 菌株乳糖水解酶基因的表面展示质粒

Fig.1 Surface display plasmid containing lactose hydrolase gene from *Aspergillus oryzae* 112

(a) Plasmid pHyg-Pir1-P.dSIase (b) Plasmid pHyg-Pir1-Gal

1.3 酵母的转化与分子鉴定

将上述 pHyg-Pir1-Gal 使用 *Not* I 单酶切获得线性化片段，参考 Chen D 等[26]

报道的“醋酸锂一步转化法”转化解脂耶氏酵母，将 *Y.lipolytica* CGMCC7326 在 30°C 平板活化，取活化的菌株适量加入提前配置好的 200 µL 转化缓冲液中（400 g/L PEG 4000，150 mM pH 6.0 醋酸锂，150 mM DTT，0.2 mg/mL 单链 DNA），加入样品 pHyg-Pir1-Gal 的线性化片段 3-5 µg，同时用 ddH_2O 作为空白对照，39°C 孵育 90 min，期间不停上下混匀以防酵母细胞沉到管底。将转化液涂布在筛选平板 YNLHX 上(6.7 g/L YNB, 5 g/L 硫酸铵, 20 g/L 乳糖, 200 µg/mL 潮霉素以及 50 µg/mL X-gal，pH 5.5)进行筛选，30°C 生长 3-5 天后，将蓝色的单菌落转接到新的 YNLHX 平板纯化 20 次后，获得稳定遗传的转化子约 80 个（在转接传代的过程中一直保持深蓝色的转化子）。

挑取这些蓝色的转化子在 50 mL YPD 液体培养基于 30°C，200 r/min 培养 1 天，按照 Cheng H 等[27]报道的玻璃珠提取基因组的方法提取酵母转化子基因组，利用正向引物 P_{Gal}-F （5’-GGATCCGCTTCCATCAAGCATCGACTCAACGG-3’）以及反向引物 P_{Gal}-R（5'-CTCGAGTTAGTAGGCTCCCTTTCGCTGCTC-3'），根据以下条件扩增约 2.9 kb 左右长度的目的条带：变性 95°C 5 min，退火 94°C 30 s，延伸 72°C 3 min，30 个循环，并在循环结束后 72°C 延长 10 min。PCR 得到的单一条带进一步测序确定转化子的正确性。

1.4 转化子的乳糖水解酶的活性检测

采用测定邻硝基苯-β-D-半乳糖苷（*o*NPG）水解的方法来测定细胞的乳糖水解酶的活性[1]。邻硝基苯-β-D-半乳糖苷（*o*NPG）无色、易溶于水，在β -半乳糖苷酶的催化下，oNPG 发生水解生成邻硝基苯酚（*o*NP）,在 420 nm 波长下，*o*NP 有最大的吸收峰。将不同的转化子在含 50 mL YPD 培养基的 250 mL 摇瓶中 30°C 培养 48 小时，10000*g* 离心 5 min 收集细胞，醋酸钠缓冲液（50 mM, pH 5.5）洗细胞 2 次，采用β-半乳糖苷酶报告基因检测试剂盒（碧云天公司）测定酶活，并按照试剂盒使用说明书进行操作，在 420 nm 下测定吸光值。

简言之，离心后的细胞采用 15 mL 的 50 mM 的 NaAc-HAc（pH 5.5）缓冲液重悬（此时 OD_{600} 值为 40），每种细胞分别取 50 µL 加入到 450 µL 的 *o*NPG 溶液中 (*o*NPG 用 50 mM 的 NaAc-HAc 缓冲液配制成 40 µmol /L 的溶液)，然后在 50°C 振荡反应 5 小时。然后加入 500 µL 的 5 % (m/v) Na_2CO_3 溶液终止反应，离心去除细胞，再在上清中加入 pH 5.5 的 50 mM 的 NaAc-HAc 溶液至体积为 3 mL，然后在 420 nm 下测定吸光值。 1 个酶活力单位（U/mg）定义为以 *o*NPG 为底物，每分钟生成 1 µmol 的 *o*NP 所需的细胞量(折算为细胞干重，1 mL 1 OD_{600} 细胞折算干重为 0.25 mg，上述 50 µL OD_{600} 为 40 的细胞干重为 0.5 mg）。

1.5 游离细胞水解乳糖生成半乳糖与葡萄糖的性能测定

取乳糖水解酶活性最高的菌株接种在含 50 mL YPDL 液体培养基的 250 mL 的底部带挡板的摇瓶中，共 4 个摇瓶。YPDL 培养基的成分为（g/L)：葡萄糖 30，乳糖 20，酵母粉 10，蛋白胨 5，pH 6.0。在 30°C 以及 200 rpm 的摇床中培养 48 小时（此时细胞 OD_{600} 吸光值为 16。将酵母细胞培养液于 10000*g* 离心 5 分钟得到酵母细胞，分别用 50 mL 50 mM 的 NaAc-HA 缓冲液漂洗细胞 2 次，以清除培养基中未消耗完的葡萄糖以及乳糖，合并细胞，并分别用 25 mL 的 20 g/L, 50 g/L, 100 g/L 以及 200 g/L 的乳糖水溶液悬浮，得到的细胞密度为 30（OD_{600} 吸光值，细胞湿重为 10 g）。然后在 50°C 的摇床里进行转化（200 rpm），每隔 12 小时取样进行 HPLC 测定乳糖水解程度，计算乳糖水解效率（水解的乳糖量/起始的

乳糖量×100%）。

1.6 固定化细胞水解乳糖生成半乳糖与葡萄糖的性能测定

按照上述 1.5 描述的方法培养酵母细胞。在 100 g 2%的糊状海藻酸钠中加入 10 g 新鲜酵母细胞（湿重，100 mL 酵母培养液离心去除培养基后即得 10 g 湿重细胞），按照 10%的湿重比例将海藻酸钠与细胞混合均匀，通过注射器（针头内径 1 mm）滴入 2%氯化钙溶液中形成海藻酸钠圆球状固体，并于 4°C 过夜进一步固化，然后将海藻酸钠圆球用无菌水洗涤 3 次以洗出氯化钙。加入 5%乳糖水溶液 100 mL，于 50°C、200 rpm 摇床培养，每 12 小时取样至反应结束，并进行 HPLC 分析检测乳糖水解程度。

1.7 用合成赤藓糖醇后的酵母细胞作为酶水解乳糖

Yarrowia lipolytica CGMCC7326 是合成赤藓糖醇的工业菌株[28]，将乳糖水解酶基因表面展示表达盒（hp4d-Pir1-Gal-TT_{Lip2t}, 图 1b)转入该酵母后，该酵母仍具有合成赤藓糖醇的能力。为了验证其合成赤藓糖醇的能力是否受到影响，以及合成赤藓糖醇后的细胞是否仍然可以作为细胞催化剂水解乳糖生成半乳糖与葡萄糖。我们按照 Wang 等[29]的方法先用转化子合成赤藓糖醇，然后离心获得细胞，并用无菌水洗涤两次以去除培养基成分，然后再次离心并取 10 g 湿重细胞重新悬浮在 50 mL 的乳糖水溶液中（50 g/L），细胞密度与上述 1.5 一节一致，并按照上述 1.5 描述的条件进行转化并测定乳糖水解程度。

1.8 产物检测

样品于 10000*g* 下离心 5 分钟，上清过 0.2 μm 的膜，取 20 μL 进行 HPLC 检测分析。流动相为纯水，流速为 1 mL/min，柱温为 70 ℃，分析色谱柱为 KS802（Shodex），分析软件为浙大 N2000，糖类的含量采用内标法定量。

2. 结果

2.1 表面展示表达乳糖水解酶的解脂耶氏酵母转化子的筛选与鉴定

本研究采用的解脂耶氏酵母是合成赤藓糖醇的工业菌株，由葡萄糖合成赤藓糖醇的得率在 50-55%之间[28-29]。该酵母由于缺乏编码半乳糖苷酶或者乳糖水解酶的基因，仅由乳糖作为唯一的碳源时，解脂耶氏酵母不能生长，而表达半乳糖苷酶基因的转化子可以生长。所以，以乳糖作为营养筛选标记，理论上，在仅有乳糖作为唯一碳源的基本固体平板上能生长的转化子均为阳性转化子。为了增加转化子的正确率并降低培养过程染菌的概率，我们还在筛选培养基中添加潮霉素以及 X-gal 来提高转化子的阳性率。能在含有乳糖、潮霉素以及 X-gal 的固体培养基上能生长并且变蓝的转化子即为乳糖水解酶表面展示表达的转化子。能在含有乳糖、潮霉素以及 X-gal 的基本培养基平板上（YNLHX）生长的菌落大部分为蓝色，但一部分为浅蓝，一部分为深蓝，一部分不变蓝（图 2a）。将原始深蓝色的转化子在 YNLHX 筛选平板上转接传代多次后，转接一次后有的即变为淡蓝色（图 2b），转接 7 次后有的即变为白色（图 2c），而有的转化子在经过转接传代 20 次后仍然为深蓝色（图 2d）。由图 2b 与图 2d 可以看出，经过 20 次转接传代，约有 50%的转化子不再为蓝色，而是转变为白色，说明在转接传代过程中，有相当一部分外源的乳糖水解酶基因发生丢失。

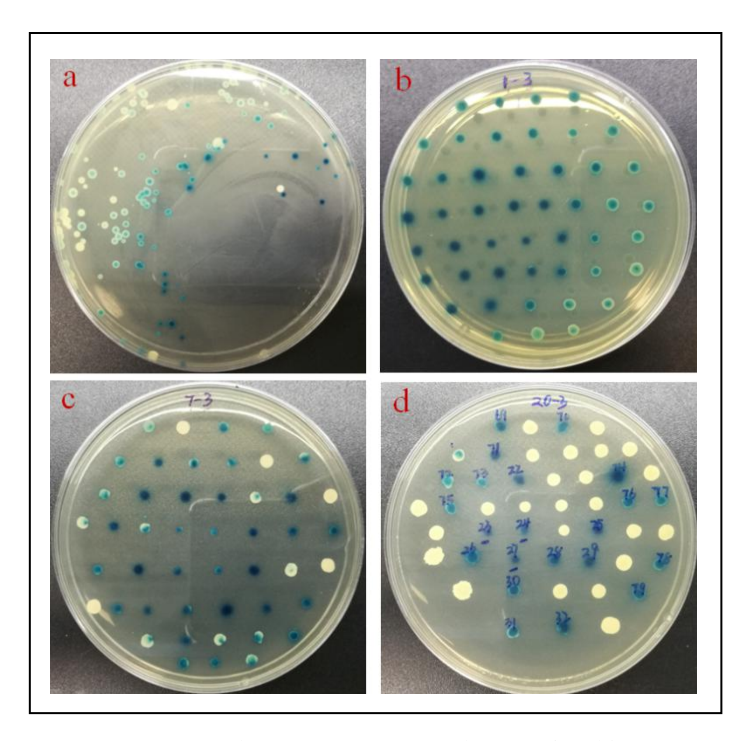


图 2 在 YNLHX 平板上生长的酵母转化子

Fig.2 Yeast transformants grown on YNLHX plate

(a) Transformants grown on YNLHX plate

(b) The yeast positive transformants grown on YNLHX plate

(c) Color variations of yeast positive transformants by successive seven purification on YNLHX plate

(d) Color variations of yeast positive transformants by successive twenty purification on YNLHX plate

我们选取 4 个一直保持深蓝色的转化子，4 个在传代过程中蓝色变淡的转化子，2 个在传代过程中变白色的转化子进行 PCR 分子鉴定，发现在多次传代后由蓝色变为白色的转化子不能扩出乳糖水解酶基因（图 3，lane 9-10)，说明在传代过程中乳糖水解酶基因丢失,而在传代过程中一直保持深蓝色的转化子含有乳糖水解酶基因（图 3，lane 1-4）。虽然有的菌在传代过程中蓝色变淡，但仍然含有乳糖水解酶基因（图 3，lane 5-8）。

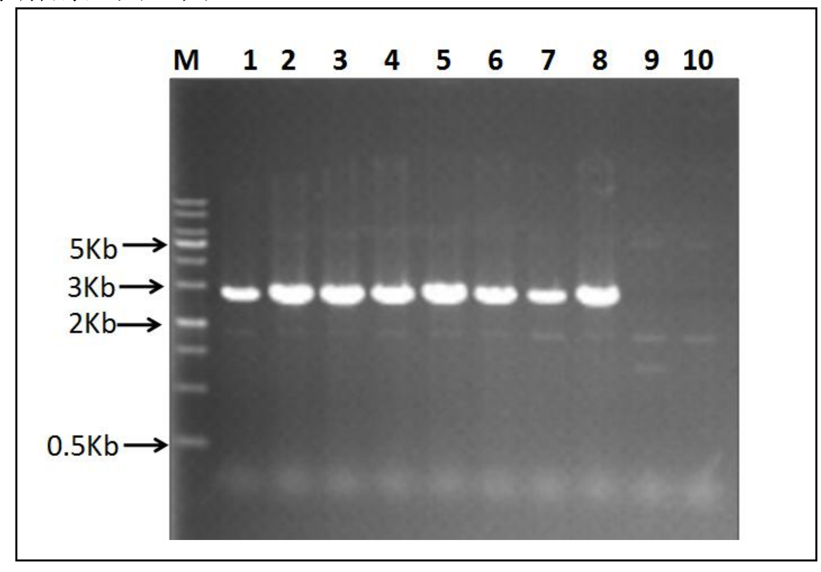


图 3 *Y. lipolytica* 转化子的分子鉴定

Fig.3 Molecular identification of *Y. lipolytica* transformants

M: DNA molecular standard; **1-4:** The PCR results of lactose hydrolase gene of four transformants that remained dark blue; **5-8:** The PCR results of lactose hydrolase gene of four light blue transformants; **9-10:** The PCR results of lactose hydrolase gene of two white transformants.

我们再分别选取深蓝、淡蓝以及白色的转化子各一个用于水解 5%乳糖的试验，结果发现在 20 小时内深蓝的转化子能水解 95%的乳糖（图 4，a），浅蓝色的转化子仍残留 30%的乳糖（图 4，b），而白色的转化子则不能水解乳糖（图 4, c）。我们将这些转接传代 20 次仍然为深蓝色的稳定的转化子用于水解乳糖的各种试验。

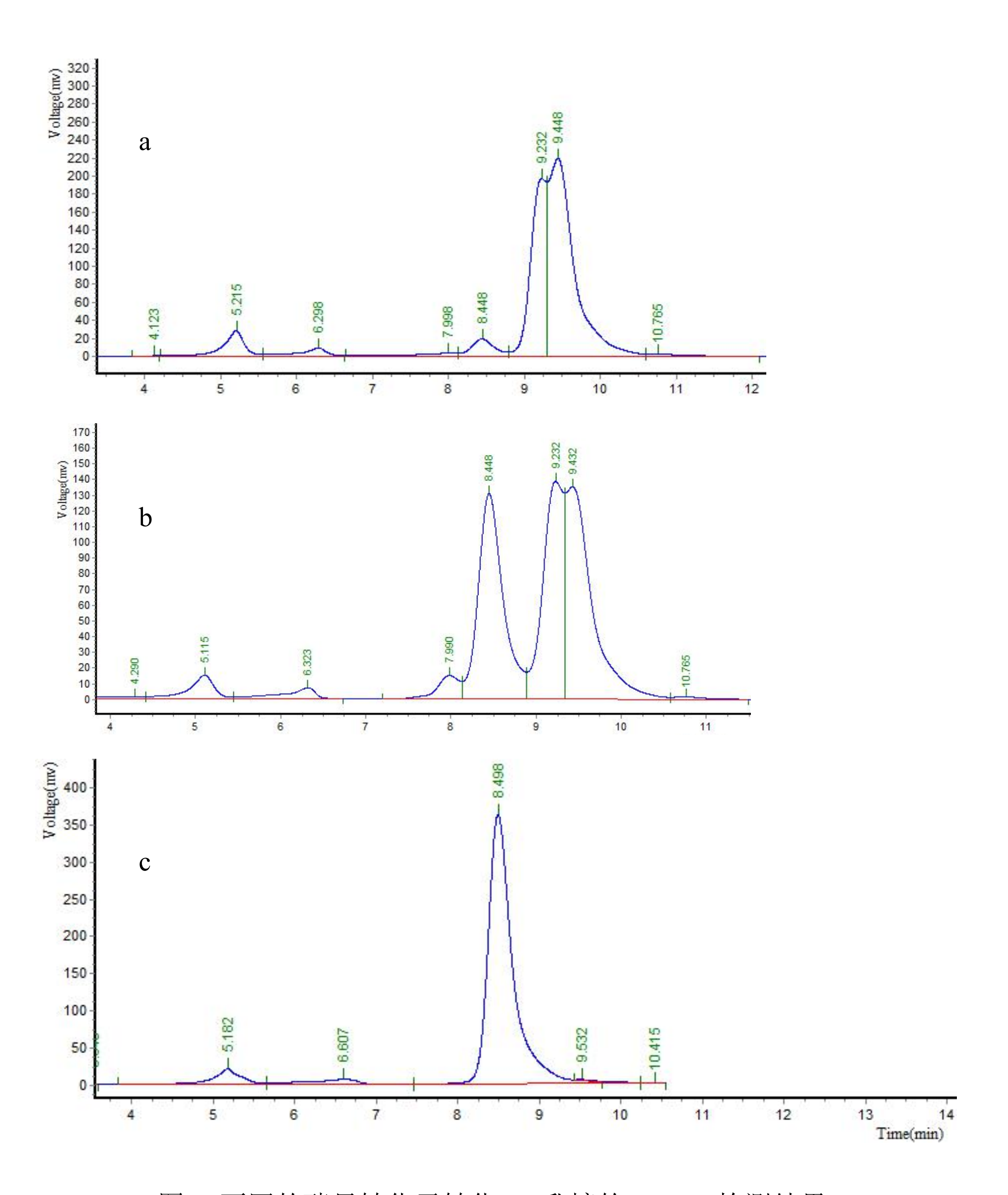


图 4 不同的酵母转化子转化 5%乳糖的 HPLC 检测结果

Fig. 4 HPLC results of transformation of 5% lactose by different yeast transformants

2.2 最优转化子的确定

通过 20 次的转接传代，我们选取了 20 个一直保持深蓝色的转化子，然后通过对这 20 个转化子的乳糖水解酶活性的测定，选取一个乳糖水解酶活性最佳的转化子进行转化乳糖的试验。通过邻硝基苯-β-D-半乳糖苷（oNPG）水解的方法来测定细胞的乳糖水解酶的活性。测定结果如图 5 所示。由图 5 可以看出，这些深蓝色的转化子的乳糖水解酶的活性并没有显著的差异，活性介于 6.5-8.0 U/mg 细胞干重，但 10 号转化子的活性要高于其它的转化子，因此我们选取 10 号转化子（HCY10）进行下面的试验。

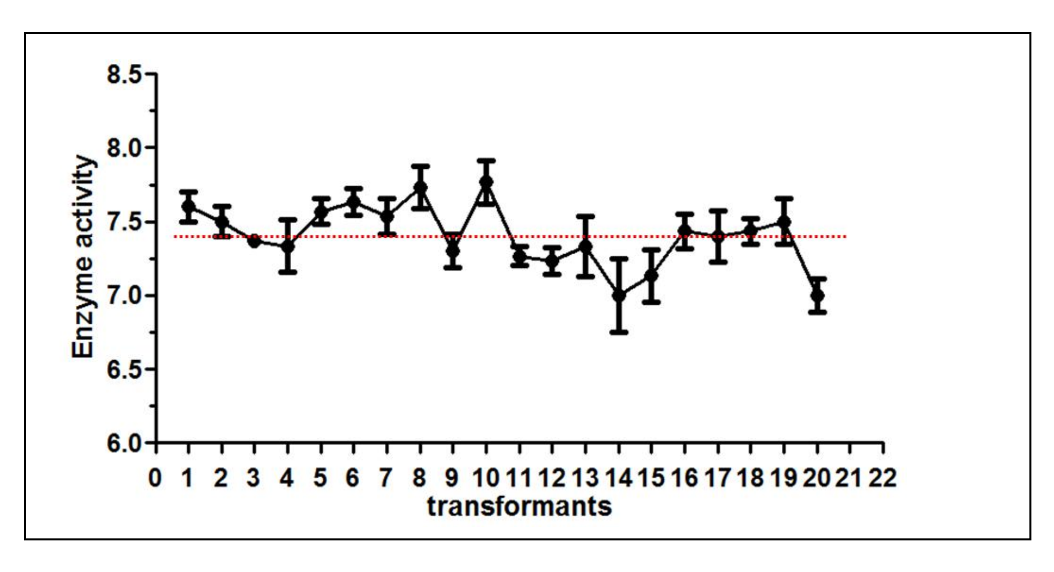


图 5　20 个深蓝色转化子乳糖水解酶活性比较

Fig.5　Comparison of lactose hydrolase activity of 20 dark blue transformants

2.3 转化不同浓度乳糖的研究

我们选取 HCY10 转化子转化不同浓度的乳糖，结果如图 6 所示。由图 6 可以看出，同样的细胞量，随着乳糖浓度的提高，乳糖水解的效率逐渐变慢。在 12 小时内能将 20 g/L 的乳糖完全水解，在 24 小时内能将 50 g/L 的乳糖完全水解。而在 24 小时内，同样的细胞量在 100 g/L 乳糖浓度中水解效率只有 30%，在 200 g/L 的乳糖中水解效率只有 12%，说明高浓度的乳糖会抑制酶的活性。

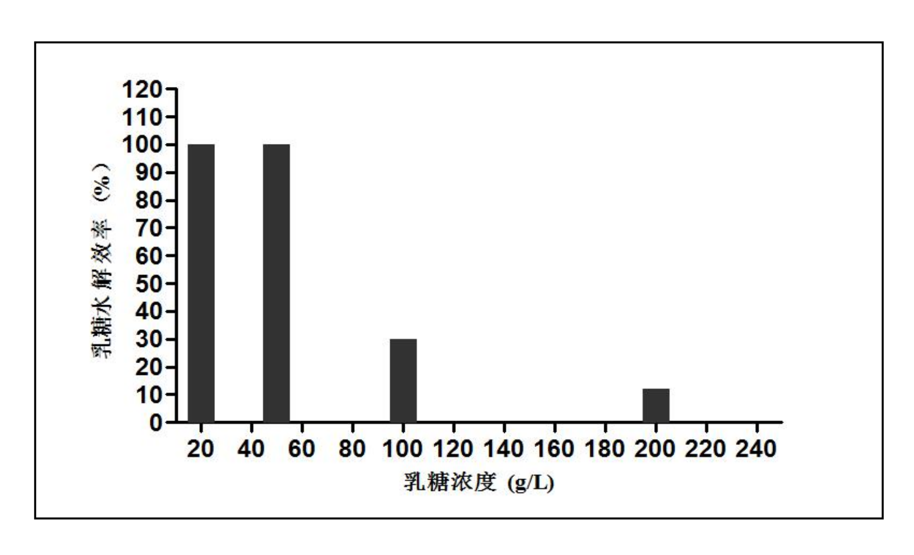


图 6　HCY10 转化子水解不同浓度乳糖的效率

Fig.6　The hydrolysis efficiency of the HCY10 strain in different lactose concentrations

2.4 固定化细胞水解乳糖的研究

由于游离的细胞能在 24 小时内能完全水解 50 g/L 的乳糖，因此我们进一步试验利用固定化的 HCY10 细胞水解浓度为 50 g/L 的乳糖。与游离细胞相比，含同样细胞量的固定化细胞在同样的条件下，需要经过 40 小时才能将 50 g/L 浓度的乳糖完全水解。可见固定化细胞的转化效率不及游离的细胞，原因为细胞被固定化后，固定化介质阻碍了底物与细胞的接触，同时减慢了产物离开细胞的速率。但是固定化细胞能够重复利用，转化结束后固定化微球即能进行下一轮转化，而游离细胞若再次利用就需离心，再次悬浮等过程，增加了操作步骤。在本研究中，固定化细胞重复利用 10 次后水解乳糖的效率由 100%仅下降为 90%。因此，采用固定化细胞水解乳糖最大的优点就是能够反复利用，有效的减少了成本。

2.5 转化子合成赤藓糖醇的性能以及以合成赤藓糖醇后的细胞水解乳糖的研究

转化子 HCY10 不但能高效水解乳糖，还能合成赤藓糖醇。为了测试其过表达乳糖水解酶并展示在细胞表面后，其合成赤藓糖醇的性能是否受到影响，我们用该转化子合成赤藓糖醇，并与对照菌株 *Y.lipolytica* CGMCC7326 进行对比。由图 7 可见，HCY10 与对照 *Y.lipolytica* CGMCC7326 菌株合成赤藓糖醇的性能基本一致。在 96 小时内，在完全相同的条件下，合成基本相同量的赤藓糖醇，由葡萄糖合成赤藓糖醇的转化率为 52%。因此，HCY10 转化子虽然能水解乳糖，但是其合成赤藓糖醇的性能并没有发生改变，仍然能高效合成赤藓糖醇。

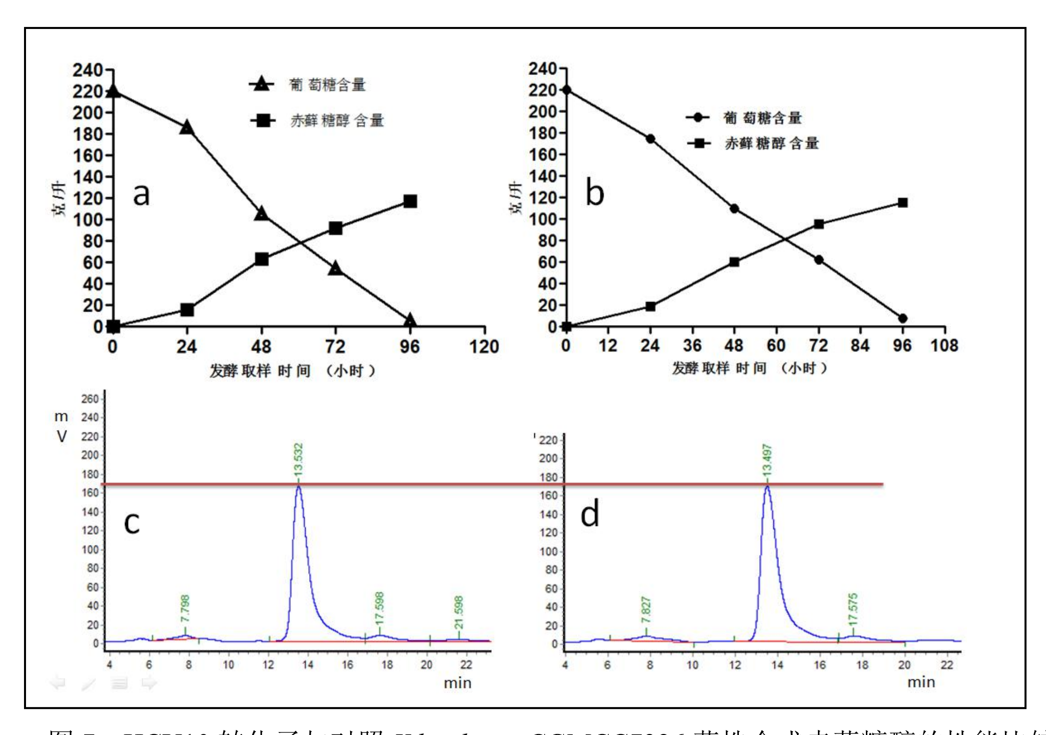


图 7　HCY10 转化子与对照 *Y.lipolytica* CGMCC7326 菌株合成赤藓糖醇的性能比较

Fig.7　Comparison of erythritol synthesis by HCY10 transformant and control *Y.lipolytica* CGMCC7326 strain

图 7 中，a 与 b 比较:HCY10 转化子与 CGMCC7326 菌株由葡萄糖合成赤藓糖醇的时间变化曲线，在取样的时间点二者葡萄糖消耗与合成的赤藓糖醇基本一致。c 与 d 比较：在 96 小时时二者发酵液的 HPLC 色谱比较，合成的赤藓糖醇量基本一致。二者色谱图的峰高基本一致，在 170 mV，13.5 min 为赤藓糖醇的峰。

利用合成赤藓糖醇后的 HCY10 细胞来水解乳糖，并与新鲜培养的 HCY10 细胞（按照材料与方法 1.5 节描述的方法培养细胞）进行比较，发现二者在相同的条件下均能在 24 小时内完全水解 50 g/L 的乳糖，生成半乳糖与葡萄糖（资料未显示）。因此，可以利用合成赤藓糖醇后的细胞来水解乳糖，达到细胞生物质资源再利用的目的。

3. 讨论

解脂耶氏酵母（*Y. lipolytica*）是一种研究最广泛的酵母之一，被美国食品药品监督局认定为公认安全的食品微生物，已经在食品工业得到广泛的应用，比如合成有机酸、赤藓糖醇、Ω-3 多不饱和脂肪酸（如二十碳五烯酸 EPA）、β-胡萝卜素等[28-32]。我们研究小组利用该酵母作为微生物细胞工厂，将果糖基转移酶、半乳糖基转移酶、海藻糖合成酶以及异麦芽酮糖合成酶表面展示在解脂耶氏酵母细胞表面，分别得到合成低聚果糖、低聚半乳糖、海藻糖以及异麦芽酮糖的工程菌株[25,33-35]。本研究将乳糖水解酶通过表面展示的方法展示在解脂耶氏酵母表面，通过培养细胞既能合成乳糖水解酶，然后将游离细胞或者固定化细胞与乳糖混合，即能实现乳糖的高效水解。

乳糖不耐症是一种比较多发的遗传缺陷症，患者不能食用含乳糖的食品。因此只能将乳糖进行水解生成半乳糖与葡萄糖后才能食用。乳糖的水解多以纯酶进行，首先需要纯化酶，步骤较多，操作比较复杂，增加了生产成本。由于酶的成本较高，为了减少该酶的成本，采用化学戊二醛固定化酶的方式增加酶的使用次数是一种较好的选择。但是当酶失效后，产生大量的固定化介质废弃物难以处理或增加废弃物处理成本。而采用本研究开发的酶表面展示固定在酵母表面的方法，能够减少酶纯化的成本，无需化学固定酶的步骤，展示的酶能够多次反复利用。当酶失效后，酵母细胞仍然能够制成酵母干粉或者酵母浸膏，当成培养基使用，整个过程持续循环，绿色环保，基本无废弃物排放。

获得稳定的酵母转化子对稳定持续合成产物至关重要。人们很早就发现含有外源基因（或质粒）的酵母转化子在转接传代的过程中会丢失外源基因的现象[36-38]。本研究通过细胞表面的乳糖水解酶对 X-gal 的显色反应来验证转化子的稳定性。经过 20 次的传代，大约有 50%的转化子在含 X-gal 的平板上培养最终变为无色，说明外源乳糖水解酶基因可能发生丢失，这些可能丢失的外源基因可能插入到染色体的不稳定区域。但也有转化子在持续的传代过程中一直保持深蓝色，说明外源基因的插入区域很稳定。通过酶活性测定，一直保持深蓝色的转化子其酶活性均较高。研究这些稳定的染色体区域的序列对于构建稳定的转化子非常重要。我们正在通过染色体步行（genome walking)的方法测定这些稳定区域的序列，为构建稳定的解脂耶氏酵母工程菌株提供充足的 DNA 元件。

参考文献

[1] Zhao Q Q, Liu F, Hou Z W, et al. High level production of β-galactosidase exhibiting excellent milk-lactose degradation ability from *Aspergillus oryzae* by codon and fermentation optimization. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(6): 2787-2799.

[2] 何梅. 乳糖酶缺乏和乳糖不耐受. 环境卫生学杂志, 1999, 26(6): 339-342.
He M. Lactase deficiency and lactose intolerance. Journal of Environmental Hygiene, 1999, 26(6): 339-342.

[3] 吴晖, 牛晨艳, 黄巍峰, 等. 乳糖不耐受症的现状及解决方法. 现代食品科技, 2006, 22(1): 152-155.
Wu H, Niu C Y, Huang W F, et al. The Actuality and solution of lactose intolerance. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(1): 152-155.

[4] Heyman M B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. Pediatrics, 2006, 118(3): 1279-1286.

[5] 王雅男, 王康才, 李同根, 等. 黄蜀葵花器官中β-半乳糖苷酶的提取纯化和酶学特性研究. 江西农业学报, 2011, 23(3): 126-128.
Wang Y N, Wang K C, Li T G, et al. Purification of β-galactosidase from Flowers of *Abelmoschus manihot* and Its Characteristics. Acta Agriculture Jiangxi, 2011, 23(3): 126-128.

[6] Torres D P, Gonçalves M D, Teixeira J A, et al. Galactooligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2010, 9(5): 438-454.

[7] 杨竞成. 酶法水解乳糖生成D-半乳糖的工艺条件优化. 大连: 大连工业大学, 2016.
Yang J C. Optimization of process conditions for enzymatic hydrolysis of lactose to produce D-galactose. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2016.

[8] 刘鑫龙, 王立晖, 汤卫华, 等. β -半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖的研究. 食品安全导刊, 2015(26): 164-165.
Liu X L, Wang L H, Tang W H, et al. Studies on the synthesis of galactooligosaccharides catalyzed by β-galactosidase. China Food Safety Magazine, 2015(26): 164-165.

[9] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science, 1985, 228(4705): 1315-1317.

[10] Charbit A, Boulain J C, Ryter A, et al. Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope expression at the cell surface. EMBO Journal, 1986, 5(11): 3029-3037.

[11] Lattemann C T, Maurer J, Gerland E, et al. Autodisplay: functional display of active β-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. Journal of Bacteriology, 2000, 182(13): 3726-3733.

[12] Ernst W J, Alexra S, Lars T, et al. Expanding baculovirus surface display. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(13): 4033-4039.

[13] Boder E T, Wittrup K D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. Nature Biotechnology, 1997, 15(6): 553-557.

[14] Efimov V P, Nepluev I V, Mesyanzhinov V V. Bacteriophage T4 as a surface display vector. Virus Genes, 1995, 10(2): 173-177.
[15] Pepper L R, Yong K C, Boder E T, et al. A decade of yeast surface display technology: where are we now? Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening, 2008, 11(2): 127-134.
[16] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display applications of molecular display. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(1): 28-40.
[17] 张莉. 毕赤酵母 GPI 型细胞壁蛋白基因的挖掘及功能研究. 广州: 华南理工大学, 2014.
Zhang L. Study on the function of GPI type cell wall protein gene in *Pichia pastoris*. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.
[18] Groot P W, Ram A F, Klis F M. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(8): 657-675.
[19] Rymowicz W, Wojtatowicz M, Robak M. Use of immobilized *Yarrowia lipolytica* cells in Ca-alginate for citric acid production. Acta Microbiologica Polonica, 1995, 42(2): 163-170.
[20] Ucar F B, Celik G, Akpinar O, et al. Production of citric and isocitric acid by *Yarrowia lipolytica* strains grown on different carbon sources. Türk Biyokimya Dergisi, 2014, 39(3): 285-290.
[21] Sarris D, Galiotou-Panayotou M, Koutinas A A, et al. Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2011, 86(11): 1439-1448.
[22] Rymowicz W, Rywińska A, Marcinkiewicz M. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. Biotechnology Letters, 2009, 31(3): 377-380.
[23] Juszczyk P, Tomaszewska L, Rymowicz W. Production of mannitol by *Yarrowia lipolytica* in fed-batch fermentation. International Conference on Advances in Biotechnology, 2013.
[24] Nicaud J M, Madzak C, Vand B P, et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Research, 2002, 2(3): 371-379.
[25] Li L J, Wang H W, Cheng H R, et al. Isomaltulose production by yeast surface display of sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* on *Yarrowia lipolytica*. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 208-217.
[26] Chen D C, Beckerich J M, Gaillardin C. One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 48(2): 232-235.
[27] Cheng H R, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechology Letters, 2006, 28(1): 55-59.
[28] Cheng H R, Lv J Y, Wang B, et al. *Yarrowia lipolytica* and its use in erythritol production: Chinese patent 201310282059.X.2013.
[29] Wang S Q, Wang H W, Lv J Y, et al. Highly efficient erythritol recovery from waste erythritol mother liquid by yeast-mediated biopurification. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(50): 11020-11028.

[30] Finogenova T, Morgunov I, Kamzolova S, et al. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a review of prospects. Applied Biochemistry and Microbiology, 2005, 41: 418-425.
[31] Gao S, Tong Y, Zhu L, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β-carotene production. Metabolic Engineering, 2017, 41: 192-201.
[32] Xue Z X, Pamela L S, Seung-Pyo H, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 734-40.
[33] Zhang L B, An J, Li L J, et al. Highly efficient fructooligosaccharides production by an erythritol-producing yeast *Yarrowia lipolytica* displaying fructosyltransferase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(19): 3828-3837.
[34] An J, Zhang L B, Li L J, et al. An alternative approach to synthesizing galactooligosaccharides by cell-surface display of β-galactosidase on *Yarrowia lipolytica*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(19): 3819-3827.
[35] Li N, Wang H W, Cheng H L, et al. An integrated approach to producing high-purity trehalose from maltose by the yeast *Yarrowia lipolytica* displaying trehalose synthase (TreS) on the cell surface. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(31): 6179-6187.
[36] Das S, Hollenberg C P. A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*. Current Genetics, 1982, 6(2): 123-128.
[37] Bussey H, Meaden P. Selection and stability of yeast transformants expressing cDNA of an Ml killer toxin-immunity gene. Current Genetics, 1985, 9(4): 285-291.
[38] Kikuchi Y. Yeast plasmid requires a cis-acting locus and two plasmid proteins for its stable maintenance. Cell, 1983, 35(1): 487-493.

Cell Surface-Displaying the lactose hydrolase on *Yarrowia lipolytica*: a New Approach to Lactose Hydrolysis

WANG Yi-ying　CHENG Hai-rong

(School of Life Science and Biotechnology, State Key Laboratory of Microbial Metabolism,Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240，China)

Abstract Lactose is one of the important carbon sources for infants to obtain energy, but lactose needs to be hydrolyzed by enzyme to galactose and glucose before being absorbed. Infants and young children lacking lactose hydrolase can fall in lactose intolerance when consuming lactose-containing food. Lactose intolerance is a symptom of high incidence in China. Therefore, lactose hydrolysis with high efficiency in vitro is is of great importance to alleviate the symptoms.

The lactose hydrolase (also known as β-galactosidase) was displayed on the cell surface of the food-satefy-grade yeast *Yarrowia lipolytica*, and the engineered yeast cells are used directly to hydrolyze lactose to produce galactose and glucose. The engineered yeast cell (HCY10) can completely hydrolyze 50 g/L lactose in 24 hours to produce galactose and glucose. The method has the advantages of high efficiency and simplicity, and it can provide an alternative solution for the efficient lactose hydrolysis in vitro.

Key words Lactose Lactose hydrolase *Yarrowia lipolytica* Yeast surface display technology